

**EFEK EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia* Jack.) TERHADAP
EKSPRESI Caspase-3 PADA ORGAN HATI TIKUS GALUR SD
YANG DIBERIKAN DOXORUBICIN**

Emelda

Program Studi Sarjana Farmasi-Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan-Universitas Alma Ata
Jl.Ringroad Barat Daya No.1, Tamantirto Yogyakarta
Email: memelfarmasi@gmail.com

Abstrak

Doxorubicin sebagai agen kemoterapi tidak hanya menimbulkan efek toksik pada sel kanker, tetapi juga menimbulkan efek toksik pada sel-sel normal terutama pada organ hati dan jantung. Akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi salah satu agen imunostimulator dalam menurunkan toksisitas *doxorubicin*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ada atau tidaknya penurunan ekspresi *caspase-3* pada organ hati tikus normal yang diberikan *doxorubicin* setelah pemberian ekstrak etanol akar pasak bumi.

Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanol akar pasak bumi adalah dengan metode maserasi. Hewan uji dibagi menjadi dalam beberapa kelompok. Kelompok kontrol (Kontrol negatif, kontrol pelarut dan kontrol sehat), kelompok ekstrak akar pasak bumi 200 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan. Untuk memastikan adanya ekspresi *caspase-3* dilakukan pengecatan imunohistokimia dan dihitung jumlah sel yang terekspresi dalam persentase yang kemudian diuji dengan SPSS. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan antara kontrol negatif ($15,17 \pm 5,17$) dengan kelompok perlakuan yang diberikan *doxorubicin* dan ekstrak etanol akar pasak bumi 200 mg/kgbb ($23,59 \pm 9,28$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/kgBB meningkatkan ekspresi *caspase-3* pada tikus normal yang diberikan *doxorubicin*.

Kata kunci : *Eurycoma longifolia* Jack, *Doxorubicin*, ekspresi *caspase-3*.

**EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF PASAK BUMI ROOT (*Eurycoma longifolia* Jack.)
AGAINST EXPRESSION OF CASPASE-3 ON RAT'S LIVER ORGAN
WERE GIVEN DOXORUBICIN**

Abstract

Doxorubicin is a chemotherapeutic agent not only cause toxic effect on cancer cells, but also cause toxic effects on normal cells, especially in the liver and heart. Pasak bumi Roots (*Eurycoma longifolia* Jack.) has the potential to be developed into one of the immunostimulatory agent in reducing the toxicity of *doxorubicin*. This study aims to determine whether there is any effect of decreased expression of *caspase-3* in the liver of normal rats given *doxorubicin* after administration on the ethanol extract of the pasak bumi roots.

The method used to obtain the ethanol extract of the pasak bumi roots is by maceration method. Test animals were divided into several groups. Control Group (Negative Control, solvent control group and healthy control group), the group of pasak bumi roots 200 mg/kg bodyweight, and The treatment group. To ensure the expression of *caspase-3* was performed immunohistochemical staining and calculated

the number of cells that expressed in percent. Percent of expression then performed statistical test using SPSS.

The result of statistical test show that there were significant increase between the negative control ($15,17 \pm 5,17$) with the treatment group were given by doxorubicin and ethanol extract of the pasak bumi roots 200 mg/kg bodyweight ($23,59 \pm 9,28$). The concluded that in fact the ethanol extract of pasak bumi roots at dose 200 mg/kg bodyweight increased the expression of caspase-3 in normal rats was given by doxorubicin.

Keywords : *Eurycoma longifolia* Jack, Doxorubicin, expression of caspase-3

Received: 21 Agustus 2017

Accepted: 29 September 2017

PENDAHULUAN

Doxorubicin merupakan salah satu golongan dari antibiotik antrasiklin yang biasa digunakan untuk berbagai macam jenis kanker seperti leukimia akut, kanker payudara, kanker tulang dan kanker ovarium¹. Selain terhadap sel kanker, obat ini juga mempunyai efek toksik terhadap sel normal yang disebabkan karena adanya pembentukan radikal bebas semikuinon². Hati merupakan salah satu organ yang terkena dampak oleh toksisitas doxorubicin yang ditandai dengan perubahan organ hati seperti nekrosis, degenerasi hepatosit, dilatasi sinusoidal dan kongesti vaskular³. Stress oksidatif berperan penting dalam patogenesis doxorubicin dalam menginduksi terjadinya hepatotoksitas³.

Eurycoma longifolia adalah salah satu obat tradisional yang populer di Asia. Tanaman yang berasal dari keluarga simarubaceae ini mengandung kuasinoid (suatu terpenoid)⁴. Selain itu pula mengandung eurikomanon⁵. Akar pasak bumi mempunyai aktivitas sebagai antioksidan⁶. Penelitian yang lain juga dikatakan bahwa senyawa kuasinoid yang terkandung di dalam akar pasak bumi dimungkinkan dapat melindungi sel-sel hati dari radikal bebas dengan kemampuan menghambat peroksidasi lipid⁷. Oleh karena itu akar pasak bumi diduga dapat menurunkan toksisitas dari *doxorubicin* dengan menghambat pembentukan radikal bebas yang diakibatkan oleh obat tersebut, sehingga apoptosis pada sel normal tidak terjadi.

Salah satu gen yang terlibat dalam peristiwa apoptosis adalah *caspase-3* yang merupakan bagian dari keluarga *caspase* atau *cystein aspartate-specific protease* dan berperan sebagai efektor *caspase* yang terlibat langsung dalam memulai degradasi sel

yang menyebabkan apoptosis baik jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik⁸. Caspase-3 dapat terekspresi di berbagai organ terutama pada hati dan ginjal^{9,10}. Adanya peningkatan ekspresi dari *caspase-3* ini dapat menunjukkan semakin meningkatnya kemampuan sel untuk melakukan apoptosis.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian apakah akar pasak bumi dapat menurunkan toksisitas *doxorubicin* pada organ hati tikus normal melalui mekanisme molekuler dengan melihat gambaran dari ekspresi *caspase-3* yang merupakan gen eksekutor pada jalur pemacuan apoptosis.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, alat-alat gelas, toples maserasi, *magnetic stirrer*, kertas saring, penangas air, *rotary evaporator*, karet pengikat, pot tempat ekstrak, batang pengaduk dan cawan porselen, mikropipet 20;200;1000 µl, alat-alat gelas, timbangan analitik, mikroskop, sarung tangan, masker, alat bedah.

Bahan yang digunakan adalah Serbuk akar pasak bumi, etanol 70 %, tikus Galur SD (*Sprague dawley*), Aquadest, *Doxorubicin* yang diproduksi oleh PT. Actavis Indonesia, CMC-Na. formalin 10%, larutan NaCl fisiologis, blok paraffin, xylol, alkohol 80%, 90% dan 100%, metanol, H₂O₂, antibodi primer (*caspase-3*), antibodi sekunder (Trakkle Link), larutan PBS, DAB, substrat kromogen.

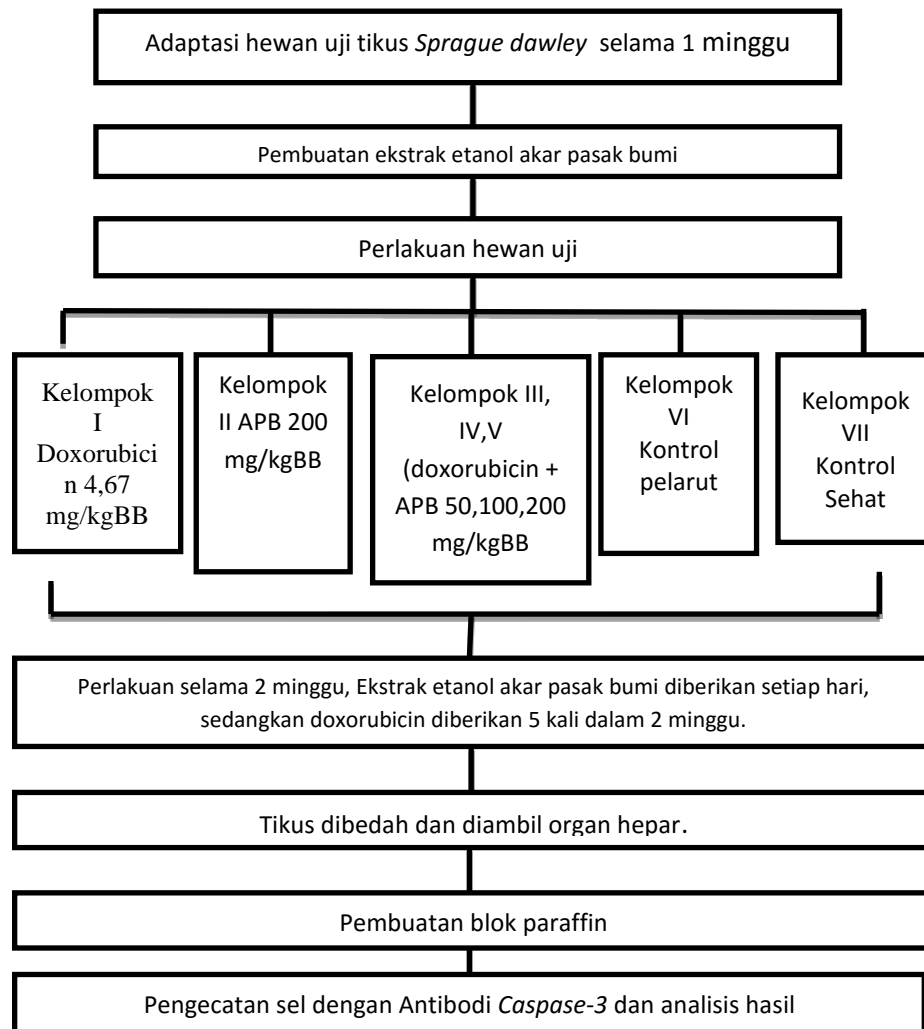
Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental, secara sistematis rancangan penelitian yang dilakukan terlihat pada gambar 1.

Ekstraksi Akar Pasak Bumi

Sebanyak 1000 g serbuk akar pasak bumi diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% 3L kemudian diaduk selama tiga jam dengan menggunakan stirer. Setelah itu didiamkan selama 24 jam yang bertujuan untuk mengoptimalkan maserasi dari akar pasak bumi. Kemudian disaring menggunakan corong buchner yang telah dilapisi kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh maserat yang

kental kemudian dimasukan dalam cawan porselin lalu dipanaskan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak yang kental.



Gambar 1. Skema Penelitian Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi Dalam Menurunkan Toksisitas Obat *Doxorubicin*.

Persiapan dan Pengelompokan Subjek Uji

Tikus betina galur SD umur 3 minggu dikandangkan dalam kandang plastik yang ditutup dengan anyaman kawat. Tikus dipelihara dengan kondisi dan pakan yang sama. Sebelum digunakan untuk penelitian, tikus diadaptasi selama 1 minggu di kandang pemeliharaan. Selama penelitian tikus ditimbang setiap harinya untuk mengetahui perkembangan berat badan. Tikus umur tiga minggu secara acak dibagi menjadi 7 kelompok seperti pada Gambar 3. Kelompok I (kelompok kontrol negatif), hewan uji

mendapatkan obat *doxorubicin* saja sebanyak 5 kali dalam 2 minggu dengan dosis 4,67 mg/kgbb. Kelompok II (kelompok ekstrak etanol akar pasak bumi 200 mg/kgbb), Kelompok III, IV, dan V (kelompok perlakuan), hewan uji mendapatkan pakan dan minum seperti kelompok yang lain dan diberi *doxorubicin* dosis 4,67 mg/kgbb 5 kali dalam 2 minggu, dengan penambahan ekstrak etanol akar pasak bumi dosis 50 mg/kg bb (kelompok III), 100 mg/kg bb (kelompok IV), dan 200 mg/kg bb (kelompok V). Kelompok VI, (kelompok tikus tanpa diberi sampel hanya diberi pelarut CMC Na 1 %) dan kelompok VII hewan uji yang hanya diberi pakan dan minum tanpa diberi sampel ataupun pelarut CMC-Na.

Uji Imunohistokimia

Organ hati yang telah difiksasi kemudian dibawa ke laboratorium patologi kedokteran umum UGM. Pembuatan preparat diawali dengan *trimming* yaitu pemotongan jaringan setebal 3-5 mm dan 1 x 1 cm menggunakan pisau skapel kemudian dimasukkan dalam *embedding cassette*. Selanjutnya yaitu dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan etanol secara bertingkat. Larutan etanol yang digunakan berturut-turut adalah etanol 80 % sekali selama 2 jam, etanol 95% sebanyak 2 kali, masing-masing 2 jam dan etanol 100% sebanyak 3 kali masing-masing 1 jam. Kemudian *cleaning* menggunakan *xylene* sebanyak 3 kali yang bertujuan untuk membersihkan jaringan dari cairan dehidrasi. Setelah dilakukan *cleaning*, pembuatan dilanjutkan dengan *impregnasi* yaitu penggunaan reagen pembersih paraffin dengan cara penetrasi dalam jaringan dan dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing 60 menit. Jaringan yang telah dimasukkan dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold* dan diisi dengan paraffin cair. Setelah itu jaringan dipotong menggunakan pisau konvensional dan mikrotom sliding (*cutting*) dengan ketebalan 5-7 mikron. Hasil pemotongan selanjutnya direndam 24 dengan air hangat di atas *hot plate* selama 0,5 jam. Kemudian blok parafin dilakukan pengecatan dengan *Meyer Hematoxylin* dan diamati di bawah mikroskop cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Akar Pasak Bumi

Sebanyak 1000 g serbuk akar pasak bumi diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% 3L kemudian diaduk selama tiga jam dengan menggunakan stirer. Etanol yang bersifat semipolar dimungkinkan dapat menarik senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang optimal yaitu kelarutan yang cukup dan kemampuan absorpsi yang optimal untuk menembus membran sel (11). Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 40,2743 gram dan rendemen sebesar 4,03%.

Pengujian Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi

Pada penelitian ini digunakan hewan uji tikus betina galur SD (*Sprague dawley*). Tikus SD merupakan jenis tikus yang paling umum digunakan dalam penelitian mengenai toksikologi, farmakologi dan analisis perilaku¹². Kelebihan dari tikus SD terletak pada ketenangan dan kemudahan dalam penanganannya. Hewan uji diadaptasikan terlebih dahulu selama 3 minggu dalam kondisi laboratorium dengan rutin diberikan pakan dan minum, tujuan adaptasi adalah untuk menghindari hewan uji mengalami stress saat perlakuan.

Sebagai kontrol negatif digunakan *Doxorubicin* yang merupakan salah satu obat terapi kanker terutama untuk terapi kanker payudara, dimana selain berefek toksik terhadap sel kanker, obat ini juga menimbulkan efek toksik pada sel normal. Toksisitas dari doxorubicin yang utama adalah kardiotoxikitas dan hepatotoksisitas. Perlakuan dilakukan selama 2 minggu, dimana ekstrak etanol akar pasak bumi diberikan setiap harinya pada hewan uji, sedangkan *doxorubicin* hanya diberikan 5 kali dalam 2 minggu.

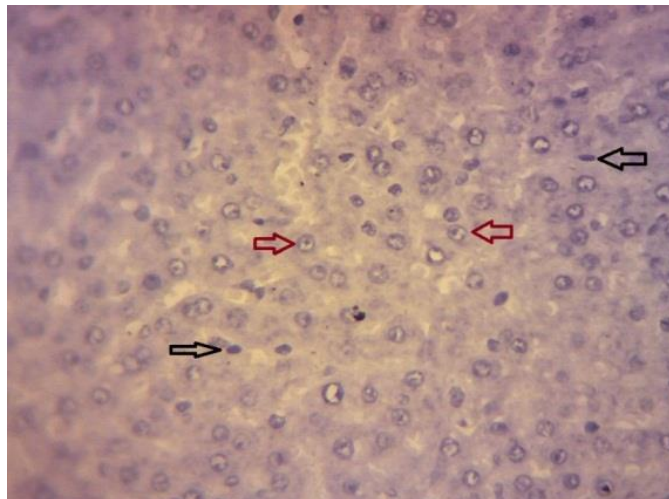
Uji Imunohistokimia

Metode yang digunakan dalam pengecatan imunohistokimia adalah metode tidak langsung yaitu antigen diikatkan pada antibodi primer secara langsung, kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang mengikat enzim peroksidase, alkali fosfatase atau glukosa oksidase. Antibodi primer dan sekunder tersebut kemudian ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna (pigmen) yang akan mewarnai sel¹³.

Ekspresi *caspase-3* diharapkan menurun dengan adanya ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.). Penurunan *caspase-3* akan menunjukkan semakin

menurunnya kemampuan sel tersebut untuk melakukan apoptosis pada sel normal yang telah diberikan *doxorubicin*. Ekspresi *caspase-3* diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Hasil pengamatan ekspresi caspase-3 dapat dilihat pada gambar 2. Hasil pengamatan tersebut kemudian dilakukan penghitungan persen ekspresi dengan cara jumlah sel yang terekspresi dibagi dengan jumlah seluruh sel dikalikan 100%. Persen ekspresi yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 3.

Data persen ekspresi yang diperoleh dari masing-masing perlakuan, kemudian dilakukan uji statistik. Uji yang pertama adalah uji normalitas *Kolmogorov – smirnov*. Hasil uji normalitas diperoleh $p > 0,05$ sehingga data persen ekspresi terdistribusi normal. Selain itu, juga dilakukan uji homogenitas dengan uji Levene. Hasil uji menunjukkan bahwa $p < 0,05$ yang berarti data tersebut tidak homogen, sehingga dilakukan analisis statistik *non parametric* yaitu uji *kruskall wallis* untuk melihat apakah ada perbedaan dari semua kelompok dengan menggunakan taraf kepercayaan 95%. Dari hasil analisis *kruskall wallis* diperoleh $p < 0,05$ yang berarti ada perbedaan antara kelompok perlakuan. Untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan tersebut dilakukan analisis *Mann whitney*.



Gambar 2. Foto Mikroskopis Hasil Imunohistokimia *Caspase-3* yang Terekspresi (*panah merah*) dan yang Tidak Terekspresi (*panah hitam*).

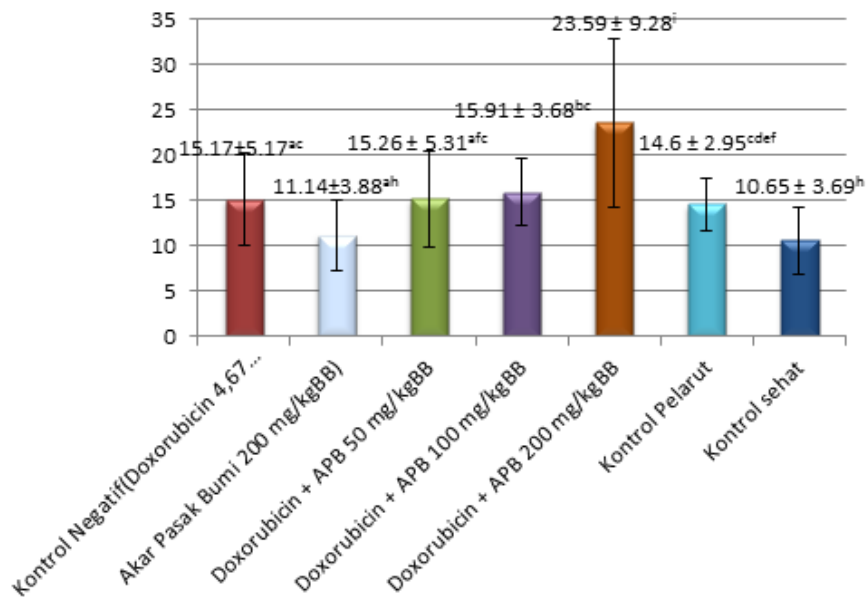
Berdasarkan tabel 1 dan gambar 3 dapat dilihat bahwa *doxorubicin* (kelompok 1) mengalami peningkatan ekspresi *caspase-3* dibandingkan kelompok sehat (kelompok 7)

yang berarti *doxorubicin* memacu terjadinya apoptosis (kematian sel) pada sel normal, karena pada penelitian ini hewan uji tidak diinduksi kanker. Begitu juga dengan kelompok ekstrak etanol akar pasak bumi (kelompok 2) mengalami peningkatan ekspresi dibandingkan kelompok sehat (kelompok 7). Meskipun peningkatan yang terjadi tidak sebesar *doxorubicin*. Selain itu, pada kelompok kontrol pelarut CMC-Na (kelompok 6) ternyata aktivasi *caspase-3* juga meningkat. Hal ini dapat disebabkan karena adanya proses homeostasis dari sel untuk mempertahankan keseimbangan kehidupan¹⁴ oleh pengaruh zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Selain itu pula, glukosa dapat menginduksi terjadinya kerusakan pada jaringan yang kemudian memediasi pengaktifan golongan *caspase-cascade* termasuk *caspase-3* yang kemudian menginduksi terjadinya apoptosis¹⁵. Ketika *doxorubicin* dikombinasikan dengan ekstrak etanol akar pasak bumi yaitu pada kelompok perlakuan, baik kelompok 3, kelompok 4 ataupun kelompok 5, ekspresi *caspase-3* justru semakin meningkat.

Tabel I. Rerata Ekspresi *Caspase-3* ± SD Pada Kelompok Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan (µg/ml)	Rata-rata(X±SD)
I	Kontrol Negatif(<i>Doxorubicin</i> 4,67 mg/kgBB)	15,17 ± 5,17 ^{ac}
II	Akar Pasak Bumi 200 mg/kgBB)	11,14 ± 3,88 ^{ah}
III	<i>Doxorubicin</i> + APB 50 mg/kgBB	15,26 ± 5,31 ^{afc}
IV	<i>Doxorubicin</i> + APB 100 mg/kgBB	15,91 ± 3,68 ^{bc}
V	<i>Doxorubicin</i> + APB 200 mg/kgBB	23,59 ± 9,28 ⁱ
VI	Kontrol Pelarut	14,6 ± 2,95 ^{cdef}
VII	Kontrol sehat	10,65 ± 3,69 ^h

Ket : Huruf berbeda di belakang rata-rata menunjukkan nilai berbeda signifikan (p<0,05).



Gambar 3. Hasil Ekspresi *Caspase-3* Tikus SD yang Diberikan *Doxorubicin* oleh Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi.

Peningkatan persen ekspresi ini juga diperkuat dengan hasil uji statistik, Yang memperlihatkan bahwa aktivasi *caspase-3* pada kelompok *doxorubicin* mengalami peningkatan yang berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat. Hal ini berarti *doxorubicin* melepaskan radikal bebas yang kemudian dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel-sel normal. Pada kelompok akar pasak bumi (200 mg/kgbb) dan kontrol pelarut (CMC-Na 1%), aktivasi *caspase-3* juga mengalami peningkatan dibandingkan dengan kontrol sehat. Peningkatan ekspresi pada kelompok akar pasak bumi adalah berbeda tidak signifikan jika dibandingkan dengan kelompok sehat ($\text{sig}=0,67$) yang berarti secara statistik peningkatan ekspresi *caspase-3* pada akar pasak bumi tidak begitu berpengaruh pada sel normal. Sedangkan pada kontrol pelarut hasilnya adalah berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol sehat ($\text{sig}=0,034$). Dari semua kelompok perlakuan, baik dosis akar pasak bumi yang diberikan 50 mg/kgbb, 100 mg/kgbb ataupun 200 mg/kgbb ternyata meningkatkan ekspresi dari *caspase-3*. Tetapi kenaikan *caspase-3* pada dosis 50 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb mempunyai harga yang berbeda tidak bermakna dengan kelompok kontrol negatif, sedangkan untuk dosis 200 mg/kgbb mempunyai harga yang berbeda bermakna dengan kontrol negatif dan juga dengan kelompok akar pasak bumi. Hal ini berarti kombinasi *doxorubicin* dengan dosis akar

pasak bumi 50 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb secara statistika tidak menaikkan ekspresi *caspase-3* dibandingkan dengan dosis 200 mg/kgbb.

Dengan peningkatan ekspresi *caspase-3* ini, dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 50, 100 ataupun 200 mg/kgbb tidak mampu untuk menurunkan toksisitas dari *doxorubicin*. Tetapi bahkan semakin meningkatkan toksisitas dari *doxorubicin* dengan semakin memacu terjadinya apoptosis yang dilakukan oleh *doxorubicin* pada sel-sel normal. Peningkatan ekspresi *caspase-3* menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi semakin meningkatkan terjadinya apoptosis (kematian sel) pada sel normal yang diberikan *doxorubicin*. Hal ini dapat dimungkinkan karena adanya beberapa senyawa yang terkandung di dalam ekstrak tersebut dan salah satunya adalah senyawa alkaloid yang bersifat toksik sehingga menghambat kerja enzim yang terlibat dalam metabolisme lipid intraseluler dan mengakibatkan kematian sel (apoptosis dan nekrosis)¹⁶. Selain itu juga adanya senyawa kuasinoid yaitu eurykomanon yang terkandung di dalam ekstrak etanol akar pasak bumi yang telah diketahui memacu terjadinya apoptosis pada sel kanker¹⁷ dimungkinkan juga dapat memacu terjadinya apoptosis pada sel normal.

Namun hasil ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ketoksikan ekstrak etanol akar pasak bumi dan penelitian serupa dengan dosis ekstrak etanol akar pasak bumi yang lebih rendah.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol akar pasak bumi 200 mg/kgBB meningkatkan ekspresi dari *caspase-3* pada sel normal yang diberikan *doxorubicin*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Childs, A. C., Sharon L. Phaneuf, Amie, J. Dirks, Tracey P., Christiaan L., 2002, Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio, *Cancer Research*, **62**(16): 4592-4598.
2. Gewirtz, D. A., 1999, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol*, **57**: 727-741.

3. Yagmurca, M., Orhan Bas, Hakan, M., Onder, S., Ahmet, N., Ozcan, K., Ahmet, S., 2007, Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats, *Archives of medical research* **38**(4): 380-385.
4. Tee T.T. and Azimahtol, 2006, Induksi Apoptosis oleh sari *Eurycoma longifolia*. School of Biosciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology. L., *Research*, National University of Malaysia, UKM Bangi, Selangor, Malaysia
5. Supriadi, Eviza, Harini, M.S., Sumarsono, S., Nuhnung, I.A., Indrayani, R., Sudiarto, Kemala, S., Indrawanto, S., and, Yusron, M., 2001, *Tumbuhan obat Indonesia ; Penggunaan dan khasiatnya*, Pustaka populer Obor, Jakarta.
6. Varghese, C. P., Ambrose., 2013, Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of *Eurycoma Longifolia* Jack, A Traditional Medicinal Plant in Malaysia.
7. Panjaitan, R. G. P., Wasmen, E. Handharyani, dan Chairul, 2011, Aktivitas Hepatoprotektor Ekstrak Metanol Akar Pasak Bumi dan Fraksi-Fraksi Turunannya, *Jurnal Veteriner* **12**(4): 319-325.
8. Utami, S., 2007, Peran Kaspase pada Apoptosis sebagai Salah Satu Usaha dalam Kemoterapi Kanker, *Jurnal Kedokteran Maranatha*, **7**(1).
9. Fernandes-Alnemri, T., Litwack., Alnemry, 1994, CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, **269**(49): 30761-30764.
10. Nicholson, D. W., 1995, Identification and Inhibition of The ICE/CED-3 protease necessary for Mammalian apoptosis, *Nature*, **376**: 37-43
11. Arifah, A.N., Nurhasanah, 2014, Efek Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Secara *In vitro*, *Pharmaciana* Vol.4 No. 1: 9-14
12. Ace, A., 2007, Sprague Dawley, Retrieved 25 April, 2007, from <http://aceanimals.com>.
13. Meiyanto E., 2009, Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan metode imunositokimia. *CCRC, 03-012-01*.
14. Nurani, L. H., 2011, Mekanisme Molekuler Kemopreventif dan Antikanker Senyawa Aktif Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Kajian In Vitro pada sel T47D dan In Vivo pada Kanker Payudara pada Tikus SD yang diinduksi DMBA, *Disertasi*, Universitas Gadjah Mada.
15. Allen, D. A., Steven H., Mira V., Martin J.R., Muhammad M.Y., 2003, High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases, *The FASEB journal* **17**(8): 908-910.
16. Agungpriyono, D. R., Esti Rahayu, dan Praptiwi, 2008, Uji Toksikopatologi Hati dan Ginjal Mencit pada Pemberian Ekstrak Pauh Kijang (*Irvingia Malayana Oliv ex A. Benn*), *Majalah Farmasi Indonesia*, **19**(4): 172-177.
17. Nurkhasanah and Hawariah, L. P. A., 2007, Apoptotic cell death induced by eurycomacone (*Eurycoma longifolia* Jack.) on human cervical carcinoma cells (HeLa), *Proceeding of international conference on chemical sciences (ICCS) 2007*, Yogyakarta, Indonesia